

Estudios Séricos e Inmunológicos en enfermos con Linfomas. Consideraciones sobre la probable Existencia de Fenómenos de Autoagresión¹

A. E. BACHMANN,² A. J. L. MACARIO,³ E. M. EUGUI,⁴ A. M. SPERPERATO⁵
y A. PAVLOVSKY⁶

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES HEMATOLOGICAS DE LA
ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA

Desde hace varios años nos hemos interesado en los fenómenos inmunológicos que pueden presentarse en los enfermos con linfomas, sobre todo en aquellos relacionados con posibles fenómenos de autoagresión, ya que existen tres grupos principales de diversas teorías que tratan de explicar la probable etiopatogenia inmunológica de dichos tumores.

Pavlovsky^{1, 2}, Dameshek, Schwartz y Oliner³, Metcalf⁴, sostienen que la reiterada y muy prolongada exposición a un antígeno (bacterias, virus, etc.) pueden provocar una intensa proliferación del tejido linfóide que puede degenerar en una desviación blastomatosa final.

¹ Trabajo realizado en el INSTITUTO DE INVESTIGACIONES HEMATOLOGICAS DE LA ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA y presentado en el Segundo Congreso Argentino de Hematología y Hemoterapia, Córdoba 22 de noviembre de 1966.

² Carrera del Investigador, C.N.I.C.T. Profesor Adjunto de la Facultad de Medicina de la Universidad del Salvador.

³ Becario del C.N.I.C.T. Ayudante honorario de Cátedra de la Facultad de Medicina de la Universidad del Salvador.

⁴ Becaria de FUNDALEU. Ayudanta Honoraria de Cátedra de la Facultad de Medicina de la Universidad del Salvador.

Kaplan y Smithers ⁵ y Green, Inkelas y Allen ⁶ suponen que la proliferación maligna del tejido linfóideo, es debida a una quimera materno fetal que induce fenómenos similares a la "runt disease".

Tyler ⁷, con un apoyo experimental evidente en los trabajos de Schwartz y Beldoti ⁸ y de manera más indirecta por las experiencias de varios de nosotros ⁹, emite la siguiente teoría, por lo demás bastante aceptable. Dice que el desarrollo de los linfomas se hace en varias etapas sucesivas. Por la acción de diversos agentes, bacterias, virus, aceptadas por las teorías mencionadas en primer término (^{1, 2, 3, 4}), o por radiaciones, se produce una mutación de células inmunocompetentes, con pérdida de los antígenos de histocompatibilidad. Al mutar estas células reaccionan inmunológicamente frente a las células normales con su dotación antigénica completa. Las células mutadas, permanentemente estimuladas por los antígenos de las normales, proliferan desordenadamente en forma incontrolada, desembocando este proceso proliferativo en la producción de neoplasmas del tejido linfóideo.

Con el propósito de poner a prueba la validez de esas teorías, se estudió "in vitro" material humano y animal, aplicando diversas técnicas inmunológicas.

MATERIAL Y METODOS

A) *Enfermos y controles*. Se estudiaron:

1er. grupo: 49 enfermos con linfomas (35 con linfogranuloma maligno y 14 con linfosarcoma).

2do. grupo: 35 pacientes con adenitis reactiva inespecífica.

3er. grupo: 43 enfermos con afecciones diversas del tejido conectivo (lupus eritematoso diseminado, LES, síndrome de Sjögren, púrpuras y artritis reumatoidea).

4to. grupo: hasta 139 dadores habituales de sangre, tomados como testigos normales.

B) *Grupo experimental*. Se utilizaron 100 cobayos. Parte de los resultados de estas experiencias ya publicadas ⁹ se mencionan aquí, porque los métodos aplicados a la preparación de grandes cantidades de este antígeno, fueron luego aplicados para la obtención del antígeno humano parcialmente purificado, designado como Ag ex ⁹.

C) *Preparación del antígeno*. Todos los antígenos humanos obtenidos por biopsia quirúrgica, fueron preparados a partir de los ganglios de los dos primeros grupos de enfermos. Según las sucesivas etapas de purificación parcial fueron designados como Ag 1, Ag 3 y Ag 4. ¹¹.

Ag 1. Era un extracto total de tejido ganglionar ¹², tamizado por malla de acero y suspendido en salina tamponada, luego ultrasonado (Apara-

⁵ Becario de LALCEC. (†). Fallecido el 4-I-1966.

⁹ Director del Instituto de Investigaciones Hematológicas de la Academia Nacional de Medicina.

to Mullard MSE, 25/Kc/seg). Finalmente las proteínas se determinaron en un espectrofotómetro Beckman, modelo DB. Con este antígeno se estudió 32 enfermos del primer grupo y 25 del segundo.

Ag 3. Sometido a igual proceso que el antígeno anterior hasta el tratamiento con ondas ultrasónicas. Después fue purificado parcialmente como se indicará en el antígeno experimental ¹⁰.

Ag 4. Se aislaron las células de los núcleos de los ganglios blastomatosos y también de aquellos con adenitis reactiva, por procedimientos diversos, como homogeinizaciones y centrifugaciones sucesivas con varios gradientes de sucrosa ^{11, 13, 14}. Para determinar el grado de contaminación con células enteras hasta un límite máximo del 7 % ¹³, se hicieron controles con reacción de fluorescencia por naranja de acridina ¹⁵ (microscopio Zeiss, lámpara Osram 200 watts). Para determinar si en el producto final existía DNA, RNA y otros componentes, se realizó la electroforesis en discos ¹⁶ y en agar ¹⁷, aplicando las reacciones de coloración adecuadas ^{16, 17}.

Para controlar el poder antigénico de los núcleos aislados durante los diversos procedimientos a los que fueran sometidos, se los controló por inmunofluorescencia e inmudifusión frente a sueros de LES con anticuerpos antinucleares ya conocidos ¹⁴.

Ag ex. ⁹. Al comienzo se preparó de la misma manera que el Ag 1, pero como los resultados de las técnicas inmunológicas "in vitro" no eran satisfactorios, se procedió a una purificación parcial. Después del ultrasonado, el preparado se colocó en una centrifuga refrigerada International RH 1 a 0° C y se centrifugó 20 minutos a 15.000 r. p. m. Luego se liofilizó y se almacenó a -20° C. Antes de ser empleado en las técnicas inmunológicas "in vitro", este liofilizado se solubilizó en solución tamponada a pH 7,2, los lípidos se extrajeron con cloroformo, se centrifugó y el producto final límpido, era fácilmente aplicable en las técnicas inmunológicas, después de haber determinado la concentración proteica en el espectrofotómetro. Cada lote de antígeno así parcialmente purificado, era estudiado por electroforesis en papel, acrílicos y microinmuno-electroforesis (MIE), para determinar la presencia de proteínas, lípidos, polisacáridos, DNA y RNA ^{9, 10, 16}.

D) *Investigación de las proteínas séricas en los 4 grupos humanos.* Se estudiaron los sueros por electroforesis en papel ¹², aparato LKB, discos ¹⁸ y MIE (aparato LKB). Los inmunosueros utilizados fueron preparados por el método de Proom ¹⁹ y como controles de su potencia y de su poder de resolución, se emplearon inmunosueros Behring y Hyland.

E) *Técnicas inmunológicas "in vitro".* Las que se describen a continuación fueron empleadas con pequeñas variantes tanto con antígenos y sueros humanos como con antígenos y sueros de cobayos.

1º) Inmudifusión en agar. Macrotécnica ¹² y microtécnica ^{9, 10, 14}, ésta última con accesorios LKB.

2º) Hemoaglutinación pasiva. En el Ag 1 se utilizó el método de Fulthorpe y colab.²⁰. Pero en el Ag 3 y en el Ag 4^{10, 14} se aplicaron algunas variantes de la técnica, con excelentes resultados^{10, 14}.

3º) Consumo de la antiglobulina. El antígeno utilizado fue un DNA comercial¹² o el Ag 1¹⁸.

4º) Inmunofluorescencia¹⁰. Los inmunosueros empleados, marcados con isotiocianato de fluoresceína, fueron de Microbiological Ass. Inc. La observación se realizó en el microscopio Zeiss con fluorescencia para luz ultravioleta.

5º) Fijación del complemento^{16, 14}. La lectura se realizó en fotocolímetro Crudo-Caamaño.

6º) Fijación del látex²¹. Bacto latex Difco. Gamaglobulina Haemoderivates, Wien, o el Ag 3 a igual concentración proteica que la antes citada fracción sérica.

7º) Cultivo de linfocitos periféricos²². El medio de cultivo utilizado fue el Difco 199. Se realizaron tres cultivos simultáneos de cada caso estudiado²³. a) cultivo sin estímulo de ninguna clase; b) con el agregado de fitohemoaglutinina; c) con el agregado del Ag 3²³ o del Ag 4¹⁴. Las muestras se tomaron al 3º, 6º, 10º y 15º. Se realizaron coloraciones con May Grünwald-Giemsa, toluidina y fluorescencia con naranja de acridina y cuando se lo consideró conveniente, se realizó la técnica de inmunofluorescencia²³. Para clasificar los elementos celulares se siguió el criterio expresado en otro trabajo²³.

RESULTADOS

Las alteraciones de las inmunoglobulinas observadas en 21 de los 40 enfermos (42 %), fueron siempre de tipo policlonal. Por MIE se observaron aumentos o disminuciones de las tres principales inmunoglobulinas, excepcionalmente su ausencia. En ocasiones se visualizó la proteína C reactiva. Disproteinemias semejantes se observaron en los enfermos del 2º y 3er. grupo (48 % y 40 %).

Los anticuerpos antinucleares con la técnica del consumo de la antiglobulina y el antígeno comercial, sólo se observaron en unos pocos enfermos con linfomas^{11, 12}.

Los homoanticuerpos antiglobulina humana puestos de manifiesto por la reacción de fijación del látex, se obtuvieron en número similar de los tres grupos humanos patológicos (42 %, 42 % y 51 % respectivamente). En el 6 % de los controles la reacción fue positiva, pero con más bajo título, sobre todo en comparación con el encontrado en los pacientes con colagenosis.

En el cuadro N° 1, se indican los resultados logrados en los enfermos y controles con varias de las técnicas utilizadas, empleando los antígenos Ag 3 y Ag 4. Los numeradores indican el número de casos positivos y los denominadores el número total de casos estudiados con cada técnica.

No se indican los resultados logrados con el Ag 1, ya que con éste y por inmunodifusión en agar frente al suero de un solo enfermo con linfogranuloma maligno, se lograron resultados positivos, como se indica en el cuadro N° 2.

CUADRO N° 1

ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS RESULTADOS LOGRADOS CON LOS ANTIGENOS PARCIALMENTE PURIFICADOS

Técnicas y enfermos controles	Hemoaglutinación pasiva con		Fijación del complemento con		Inmunofluorescencia	Cultivo de linfocitos con	
	Ag 3	Ag 4	Ag 3	Ag 4		Ag 3	Ag 4
Linfomas	4/11	2/6	4/11	2/6	2/6	1/7	2/7
Adenitis reactiva	0/4	1/5	0/4	0/5	2/5	0/3	0/5
Colagenosis	—	1/7	—	1/7	2/7	—	—
Dadores de sangre	0/30	0/10	0/30	0/10	0/10	0/15	0/2

' Antígeno parcialmente purificado.

" Núcleos aislados.

Numerador: casos positivos.

Denominador: número total de casos estudiados.

Puede observarse en los enfermos con linfomas, que los resultados logrados con ambos antígenos son similares, tanto para demostrar anticuerpos circulantes como fijos.

En el grupo de adenitis reactiva, sólo dos enfermos dieron resultados positivos. También dos enfermos con LES dieron iguales resultados, pero en estos últimos los Ag 3 y Ag 4 actuaron con homoantígenos. El grupo de los dadores de sangre no se demostraron homoanticuerpos.

En el cuadro N° 2 se realiza el estudio analítico de los resultados logrados en cada uno de los enfermos con linfoma que demostraron la presencia de "autoanticuerpos", por medio de las diversas técnicas.

Puede verse que todos los enfermos presentaron disproteinemias reveladas por las técnicas electroforéticas diversas. La mayoría tuvo una reacción positiva de fijación del látex. Además, salvo en el primer enfermo, los "autoanticuerpos" fueron demostrados en los restantes por dos o más técnicas realizadas simultáneamente.

Estudio de los antígenos.

Ag 1: La MIE reveló que contenía todas las proteínas séricas.

Ag 3: La electroforesis en acrílicos con la coloración del negro de amido demostró varias proteínas séricas. Con la reacción de Feulgen se observó una banda catódica difusa y con la pironina otra banda en similar ubi-

cación y otra anódica, que resultó ser un artefacto. Por MIE se visualizaron arcos de precipitación correspondientes a la albúmina, alfa, beta y gamma globulinas.

CUADRO Nº 2

ESTUDIO ANALITICO DE LOS RESULTADOS LOGRADOS CON LAS TECNICAS INMUNOLOGICAS EN LOS ENFERMOS CON "AUTOANTICUERPOS"

Técnicas y casos	Disprotelemia	Fijación del látex	Difusión en agar	Hemoaglutinación pasiva	Fijación del complemento	Inmunofluorescencia indirecta	Cultivo de linfocitos
1	+	+	+	N. R.	N. R.	N. R.	N. R.
2	+	+	Neg.	+	+	N. R.	+
3	+	Neg.	Neg.	+	+	N. R.	+
4	+	+	Neg.	+	+	N. R.	Neg.
5	+	+	Neg.	+	+	+	+
6	+	Neg.	Neg.	+	+	Neg.	Neg.

N. R.: No Realizada.

Ag 4: Los núcleos aislados antes de ser ultrasonados, revelaron una muy baja contaminación con células enteras, inferior al 7 %. La reacción de inmunofluorescencia con dos sueros de LES fue positiva, con una dilución sérica de 1/16. Después del tratamiento con ondas ultrasónicas, por electroforesis en disco y después de las reacciones de coloración de Feulgen y pironina, se observó una banda catódica con cada una de ellas. La electroforesis en agar también demostró con iguales reacciones resultados similares. Por MIE en algunas preparaciones de núcleos se demostró Ig G. Finalmente por microinmunodifusión ante un suero de LES, se visualizó una banda de precipitación.

COMENTARIOS

Los antígenos Ag 3 y Ag 4 pudieron ser fácilmente aplicados en las técnicas inmunológicas "in vitro" y tuvieron similar actividad^{10, 11, 14, 23}. Ambos tenían ácidos nucleicos y el Ag 3, también proteínas séricas¹⁰, de las cuales sólo se observó la Ig G en algunas preparaciones del Ag 4¹⁴.

Nos inclinamos a pensar que el principio activo de los Ag 3 y Ag 4 podría ser el DNA por los siguientes motivos: 1º) el Ag 3 que contenía una elevada concentración de Ig G, al recubrir el látex en lugar de la Ig G comercial, sólo dio reacciones positivas con sueros testigos de artritis reumatoidea¹⁰. En cambio este mismo antígeno (Ag 3) que además tenía RNA y DNA actuó antigénicamente en las restantes técnicas con sueros de varios enfermos con linfomas¹⁰. 2º) el RNA existente en ambos antígenos, hasta ahora sólo ha demostrado ser antigénico en casos experimentales aislados^{24, 25}. 3º) en cambio se ha demostrado que el DNA es antigénico tanto experimental^{26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34}, como clínicamente en una serie de

trabajos recientes ^{32, 35, 36, 37}. Los anticuerpos anti DNA han sido aislados en la Ig M en los primeros ³⁰ y en la Ig G en los segundos ^{30, 38}. Además los anticuerpos anti DNA se han demostrado con varias técnicas inmunológicas similares a las empleadas por nosotros en éste y en otros trabajos ^{10, 11, 14}. Sin embargo por ahora, tampoco puede descartarse que la histona de los núcleos del Ag 4 pueda actuar antigénicamente, ya que se han demostrado anticuerpos antinucleares contra esa proteína, responsable del tipo "speackled" de inmunofluorescencia ³⁹.

En cuanto a los "autoanticuerpos" demostrados en los enfermos con linfomas con ambos antígenos, caben varias hipótesis.

Como expresáramos al comienzo, creemos que la teoría de Tyler ⁷ es la que mejor explica los fenómenos de autoagresión hallados en los enfermos con linfomas ³⁵. Confirmando estos hallazgos, nuestras observaciones realizadas en cultivos de linfocitos periféricos ^{11, 14, 23}, permiten suponer que existen dos poblaciones de células inmunocompetentes, una normal que responde en forma habitual al estímulo antigénico, otra mutada, con respuesta inmunológica alterada. Esta última podría formar los "autoanticuerpos" demostrados en las reacciones "in vitro", aunque no se descarta la situación inversa.

La significación de estos anticuerpos en la etiopatogenia de los linfomas no está aclarada todavía. Pueden ser simplemente un epifenómeno o tener una participación activa en el desarrollo de la enfermedad. Para intentar la dilucidación de esta incógnita se realizarán nuevos trabajos clínicos y experimentales.

RESUMEN

Se estudiaron varios antígenos ganglionares humanos, sometidos a diversos métodos de purificación parcial, en parte ensayados en un modelo experimental.

Por medio de diversas técnicas inmunológicas, estos antígenos fueron probados "in vitro" frente a los sueros de 49 enfermos con linfoma y de otros testigos, unos con diversas afecciones y los restantes dadores habituales de sangre.

Por medio de diferentes técnicas inmunológicas, seis enfermos con linfomas presentaron "autoanticuerpos" ante sus propios antígenos ganglionares con una o más técnicas aplicadas simultáneamente.

Se discute el principio activo de estos antígenos y el significado de los "autoanticuerpos" demostrados.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Pavlovsky, A.; Galán, J. C.; Rechniewski, C.: *Rev. Soc. Argent. Hematol. Hemot.*, 1: 241. 1949.
- ² Pavlovsky, A.; Bachmann, A. E.: *Dia méd.*, 32: 1321, 1960.
- ³ Dameshek, W.; Schwartz, R.; Oliner, H.: *Blood*, 17: 775, 1961.

- ⁴ Metcalf, D.: *Brit. J. Cáncer*, 15: 1197, 1960.
- ⁵ Kaplan, H. S.; Smithers, D. W.: *Lancet*, 2: 1, 1959.
- ⁶ Green, I.; Inkelas, M.; Allen, L. B.: *Lancet*, 1: 30, 1960.
- ⁷ Tyler, A.: *J. Nat. Cáncer Inst.*, 28: 1197, 1960.
- ⁸ Schwartz, R. S.; Beldoti, L.: *Science*, 149: 1511, 1965.
- ⁹ Bachmann, A. E.; Pedace, E. A.; Sperperato, A. M.; Macario, E. C. de: *Medicina* (Bs. As.), 25: 355, 1965.
- ¹⁰ Bachmann, A. E.; Sperperato, A. M.; Eugui, M. E.; Pavlovsky, A.: *Medicina*, (Bs. As.), 26: 79, 1966.
- ¹¹ Bachmann, A. E.; Macario, A. J. L.; Eugui, E. M.; Sperperato, A. M.: *Bol. Acad. Nac. Medicina*, Bs. As., (a publicarse).
- ¹² Bachmann, A. E.; Carducci, C. N.; Conway, E. Pavlovsky, A.: *Medicina* (Bs. As.), 24: 163, 1964.
- ¹³ Srulijes, L. K. de; Holmberg, E. A. D.; Pavlovsky, A.; Rabasa, S. L.: Trabajo presentado en el VII Congreso Latino Americano de Fisiología Mar del Plata, 11/VIII/1966.
- ¹⁴ Bachmann, A. E.; Eugui, E. M.; Macario, A. J. L.; Sperperato, A. M.; Pavlovsky, A.: *Medicina* (Bs. As.), 27: 99, 1967.
- ¹⁵ Bartalanffy, L. v.; Bartalanffy, F. D.: *Naturwis.*, 47: 165, 1960.
- ¹⁶ Affronti, L. F.; Parlett, R. C.; Cornesky, R.: *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 91: 1, 1965.
- ¹⁷ Tsanev, R.: *Biochim. Biophys. Acta*, 103: 374, 1965.
- ¹⁸ Bachmann, A. E.; Pedace, E. A.; Pavlovsky, A.: *Medicina*, (Bs. As.), 25: 39, 1965.
- ¹⁹ Proom, H.: *J. Path. Bact.*, 55: 419, 1943.
- ²⁰ Fulthorpe, A. J.; Roitt, I. M.; Doniach, D.; Couchman, K.: *J. Clin. Path.*, 14: 654, 1961.
- ²¹ Singer, J. L.; Plotz, C. M.: *Amer. J. Med.*, 21: 888, 1956.
- ²² Moorhead, P. Nowell, P.; Mellman, W.; Battips, D. M.; Hungeford, D. J.: *Exp. Cell. Res.*, 20: 613, 1960.
- ²³ Bachmann, A. E.; Macario, A. J. L.; Sperperato, A. M.; Pavlovsky, A.: *Medicina*, (Bs. As.), 26: 145, 1966.
- ²⁴ Panijel, J.; Souleil, C.; Cayeux, P.: *Biochim Biophys. Acta*, 123: 221, 1966.
- ²⁵ Souleil, C.; Cayeux, P.; Panijel, J.: *Biochim. Biophys. Acta*, 123: 235, 1966.
- ²⁶ Gela, M.; Ungar-Waron, H.: *Fer. Proc.*, 24: 1438, 1965.
- ²⁷ Halloran, M. J.; Parker, C. W.: *J. Immunol.*, 96: 379, 1966.
- ²⁸ Plescia, O. J.; Braum, W.; Palczuk, N. C.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 52: 279, 1964.
- ²⁹ Plescia, O. J.; Palczuk, N. C.; Braum, W.; Cora-Figueroa, E.: *Science*, 148: 1102, 1965.
- ³⁰ Stollar, B. D.; Sandberg, A. L.: *J. Immunol.*, 96: 755, 1966.
- ³¹ Barnett, E. V.; Vaughan, J. H.: *J. Exp. Med.*, 123: 733, 1966.
- ³² Burns, R. M.; Rheins, M. S.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 122: 714, 1966.
- ³³ Levine, L.; Seaman, E.; Hammerschlag, E.; Vanukis, H. van: *Science*, 153: 1666, 1966.
- ³⁴ Povorenny, A. M.; Saienko, A. S.; Kreier, V. G.; Nasanova, V. A.: *Nature*, 211: 1297, 1966.
- ³⁵ Seligmann, M.; Cannat, A.; Hamard, M.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 124: 816, 1965.
- ³⁶ Havemann, K.; Arend, P.: *Klin. Wschr.*, 44: 19, 1966.
- ³⁷ Pérez-Quadrado, S.; Haberman, S.; Race, G. J.: *Cancer*, 18: 193, 1965.
- ³⁸ Holborow, E.; Johnson, G. D.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 124: 833, 1965.
- ³⁹ Beck, J. S.: *Lancet*, 1: 241, 1962.